

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-185782

(43) 公開日 平成10年 (1998) 7月14日

(51) Int. Cl. ⁸

識別記号

F I

G 0 1 N 1/28
21/64
21/88G 0 1 N 1/28
21/64
21/88
1/28N
Z
E
X

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平9-269898

(22) 出願日 平成9年 (1997) 10月2日

(31) 優先権主張番号 特願平8-282517

(32) 優先日 平8 (1996) 10月24日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000236436

浜松ホトニクス株式会社

静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72) 発明者 石川 満

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ
トニクス株式会社内

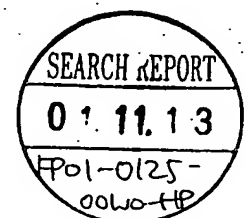
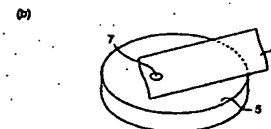
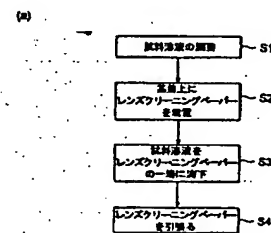
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外4名)

(54) 【発明の名称】 蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法及び基板表面の構造欠陥を可視化する方法

(57) 【要約】

【課題】 均一性の高い蛍光性分子の単一分子層を簡単に基板表面に並べることができる蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法及び基板表面の構造欠陥を可視化する方法を得る。

【解決手段】 蛍光性分子例えば吸着色素であるローダミンBを所定濃度となるようにメタノール溶液に溶解し、試料溶液7とした。基板5例えばシリコンウエハ上にレンズクリーニングペーパー6を載置した後、試料溶液7の100 μ lをレンズクリーニングペーパー6の一端に滴下した。続いて、有機溶媒が蒸発する前に、試料溶液7が基板5上を横切るようにレンズクリーニングペーパー6を引っ張った。外部から汚染物を取り込まず、溶媒や汚染物による妨害を受けずに蛍光測定や散乱光測定を行うことができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 蛍光性分子の蛍光計測を行う際に、揮発性の有機溶媒に前記蛍光性分子を所定濃度で溶解して試料溶液を調製し、

蛍光計測が行われる基板上に紙片を載置し、前記基板上に載置された前記紙片上に前記試料溶液を滴下し、次いで前記有機溶媒が蒸発する前に、この滴下された試料溶液が前記基板表面を横切るように前記紙片を引っ張ることを特徴とする蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法。

【請求項2】 前記有機溶媒は、アルコール類、エーテル類又はアセトンであることを特徴とする請求項1記載の蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法。

【請求項3】 前記紙片は、レンズクリーニングペーパー、カーボン原紙又は薄葉紙からなる紙片であることを特徴とする請求項1記載の蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法。

【請求項4】 前記蛍光性分子の濃度は、 10^{-4} M以下であることを特徴とする請求項1記載の蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法。

【請求項5】 蛍光性分子の蛍光計測を行う際に、揮発性の有機溶媒に前記蛍光性分子を所定濃度で溶解して試料溶液を調製し、

蛍光計測が行われる基板上に紙片を載置し、前記基板上に載置された前記紙片上に前記試料溶液を滴下し、

前記有機溶媒が蒸発する前に、この滴下された試料溶液が前記基板表面を横切るように前記紙片を引っ張ることにより蛍光性単一分子を基板表面に並べ、

前記蛍光性単一分子が並べられた前記基板表面にレーザー光を照射し、次いで前記基板表面で発生した蛍光を測定し、

測定した蛍光から蛍光輝点を求めることを特徴とする基板表面の構造欠陥を可視化する方法。

【請求項6】 蛍光性分子が付着した基板表面の散乱光計測を行う際に、揮発性の有機溶媒に前記蛍光性分子を所定濃度で溶解して試料溶液を調製し、

散乱光計測が行われる基板上に紙片を載置し、前記基板上に載置された前記紙片上に前記試料溶液を滴下し、

前記有機溶媒が蒸発する前に、この滴下された試料溶液が前記基板表面を横切るように前記紙片を引っ張ることにより蛍光性単一分子を基板表面に並べ、

前記蛍光性単一分子が並べられた前記基板表面にレーザー光を照射し、次いで前記基板表面で発生した散乱光を測定し、

測定した散乱光から散乱光輝点を求めることを特徴とする基板表面の構造欠陥を可視化する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法、特に、シリコンウエハ等の基板表面に、蛍光性単一分子を並べる方法、及び基板表面の構造欠陥を可視化する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】最近の蛍光検出に基づく単一分子画像法の進歩によって、室温において個々の色素分子の位置、配向、動き、光化学反応、酵素反応、励起状態の緩和過程の観察が実現されてきた。特に、走査型近視野顕微鏡法と走査型共焦点顕微鏡法による個々の色素分子の配向決定の成功は、色素分子を固定したことに起因する。この場合、色素分子はポリマー中にドープされている。これに対して、テレビカメラを備えた通常の光学顕微鏡を用いると、機械的な走査なしで、個々の分子を同時に複数個観察することが可能になる。

【0003】従来、単一分子の簡便な配列方法として、スピンコート法が行われており、この方法では、色素をポリマーを用いて基板上に展着させて均一に分散させている。なお、ここで単一分子とは、1個の分子の場合のみならず、1個ずつ区別して数えることができる限り、複数の分子の場合も含むものである（以下、同様である）。

【0004】しかし、スピンコート法では、色素をポリマーのような粘度の高い不揮発性物質で展着させないと、色素を均一に分散させることは極めて困難である。また、ポリマーのような不揮発性物質が介在すると、その物質が外部からの汚染を取り込み易くなる。特に、励起光が短波長、例えば紫外域になると、外部から取り込まれた不純物からの蛍光や、場合によってはポリマー自身の蛍光が単一分子の蛍光測定を妨害する可能性が高くなるという問題点があった。

【0005】ところで、シリコンに代表される半導体ウエハ表面のサブミクロン以下の欠陥や異物を低減化することは、例えば半導体メモリーの高集積化にとって重要なことである。その際、半導体ウエハ表面の欠陥や異物の実態を効率良く認識する方法がいくつか提案され、そして実施されている。例えば、光散乱法あるいは光散乱法と原子間力顕微鏡（以下、AFMとする）を組み合わせた方法が報告されている（例えば藤野ら、応用物理66巻第7号、1997、732-733頁）。前者の方法によって、用いる光の波長程度からその $1/10$ 程度までの大きさの異物や欠陥が検出されている。また、後者の方法によって異物や欠陥の検出のみならず、それらのサイズの評価も可能となっている。

【0006】光散乱法の特長は、欠陥や異物のサイズ（サブミクロン以下）と比較して、広いエリア（ $50 \sim 100$ ミクロン平方）に散在する欠陥や異物の有無を容易に検知できることである。しかし、光の回折限界以下のサイズの異物や欠陥は、その存在を検出できたとしても実寸を測定することはできない。また、付着した異物

と欠陥の区別は困難であるし、欠陥が周囲の平面に対して凸であるか凹であるかの区別はできない。一方、AFMでは、光散乱法では不可能な光の回折限界以下のサイズの異物や欠陥の実寸を測定することができる。しかし、前述のような広いエリアに散在し、しかもどこにあるかわからない異物や欠陥を探し出すためには、測定時間がかかるという困難を抱えている。

【0007】さらに、光散乱法とAFMを組み合わせることによって両者の欠点を補い長所を生かすことが一部可能であるが、測定時間がかかるAFMと測定時間がかからない光散乱法とを組み合わせた場合、結局測定時間はAFMの測定時間によって律速されてしまう。また、装置自身のコストの点で、AFMは有利なものではない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 前述のように、スピコート法では、外部から取り込まれた不純物からの蛍光や、ポリマー自身の蛍光が単一分子の蛍光測定を妨害する可能性が高くなるという問題点があった。また、光散乱法と同程度の簡便さと短い測定時間でかつ異物と欠陥の区別、欠陥である場合に周囲の平面に対して凸であるか凹であるかに関する情報をもたらす測定手段が望まれていた。

【0009】そこで本発明は、粘度の低い揮発性溶媒を用いても均一に個々の分子を分散させることができる単一分子を基板表面に並べる方法及び基板表面の構造欠陥を可視化する方法を得ることを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】 本発明の請求項1に記載の発明は、蛍光性分子の蛍光計測を行う際に、揮発性の有機溶媒に蛍光性分子を所定濃度で溶解して試料溶液を調製し、蛍光計測が行われる基板上に紙片を載置し、基板上に載置された紙片上に試料溶液を滴下し、次いで有機溶媒が蒸発する前に、この滴下された試料溶液が基板表面を横切るように紙片を引っ張ることを特徴とする蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法である。

【0011】この発明によれば、揮発性有機溶媒に蛍光性分子を溶解させるので、外部から汚染物を取り込み難くなり、溶媒や汚染物による蛍光測定の妨害を防止することができる。また、紙片に滴下された試料溶液を基板表面を横切るように引っ張るため、均一性の高い蛍光性分子の単一分子層を簡単に基板表面に並べることができる。

【0012】請求項2に記載の発明は、有機溶媒がアルコール類、エーテル類又はアセトンであることを特徴とする。

【0013】請求項3に記載の発明は、紙片がレンズクリーニングペーパー、カーボン原紙又は薄葉紙からなる紙片であることを特徴とする。

【0014】請求項4に記載の発明は、蛍光性分子の濃

度が 10^{-4} M以下であることを特徴とする。

【0015】請求項5に記載の発明は、蛍光性分子の蛍光計測を行う際に、揮発性の有機溶媒に蛍光性分子を所定濃度で溶解して試料溶液を調製し、蛍光計測が行われる基板上に紙片を載置し、基板上に載置された紙片上に試料溶液を滴下し、有機溶媒が蒸発する前に、この滴下された試料溶液が基板表面を横切るように紙片を引っ張ることにより蛍光性単一分子を基板表面に並べ、蛍光性単一分子が並べられた基板表面にレーザー光を照射し、次いで基板表面で発生した蛍光を測定し、測定した蛍光から蛍光輝点を求めることを特徴とする基板表面の構造欠陥を可視化する方法である。

【0016】この発明によれば、基板表面に並べられた均一性の高い蛍光性分子の単一分子層を測定するので、正確な蛍光計測を行うことができ、蛍光輝点から基板表面の構造欠陥を可視化することができる。

【0017】請求項6に記載の発明は、蛍光性分子が付着した基板表面の散乱光計測を行う際に、揮発性の有機溶媒に蛍光性分子を所定濃度で溶解して試料溶液を調製し、散乱光計測が行われる基板上に紙片を載置し、基板上に載置された紙片上に試料溶液を滴下し、有機溶媒が蒸発する前に、この滴下された試料溶液が基板表面を横切るように紙片を引っ張ることにより蛍光性単一分子を基板表面に並べ、蛍光性単一分子が並べられた基板表面にレーザー光を照射し、次いで基板表面で発生した散乱光を測定し、測定した散乱光から散乱光輝点を求めることを特徴とする基板表面の構造欠陥を可視化する方法である。この場合、付着した蛍光性分子の単一分子層は均一性が高いので、蛍光性分子それ自身は散乱光に寄与しない。

【0018】この発明によれば、基板表面に並べられた均一性の高い蛍光性分子の単一分子層が付着した基板表面を観察するので、色素分子それ自身による散乱光ではなくて、基板表面それ自身の凹凸に起因する散乱光を正確に計測することができる。この発明によって得られた散乱光輝点の位置と、散乱光観測に用いたものと同じ試料の同じ視野で蛍光輝点の位置を比較することによって、基板表面の構造欠陥を可視化することができる。

【0019】

【発明の実施の形態】 以下、添付図面に基づき、本発明の実施形態について説明する。図1は、本発明の実施形態による蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法を示す概略説明図であり、(a)はそのフローチャート、(b)は基板及び紙片であるレンズクリーニングペーパーの斜視図である。

【0020】まず、同図(a)の工程1により、蛍光性分子の蛍光計測に用いる試料溶液を調製する。試料溶液は、蛍光計測の測定対象となる蛍光性分子を、所定の濃度となるように揮発性の有機溶媒に溶解する。本発明において使用できる蛍光性分子としては、例えばローダミ

ンB、各種クマリン系色素、ローダミン6G、ローダミン110、スルホローダミン640、フルオレセイン、ウラニン、ナイルブルー、クレジルバイオレット、アクリジンオレンジや、マラカイトグリーン及びクリスタルバイオレットに代表されるトリフェニルメタン系色素、シアニン系色素等である。特に、メタノールに溶ける蛍光物質であれば、特に制約なく使用できる。

【0021】このような蛍光性分子を好適には 10^{-4} M以下の濃度、最適では 10^{-6} Mの濃度になるように有機溶媒に溶解する。蛍光性分子の濃度が 10^{-4} Mを越えると、蛍光性分子が固まる傾向が見られるため望ましくないからである。更に好適には、蛍光性分子の濃度を 10^{-7} M以上となるようにするのが望ましい。蛍光性分子の濃度が 10^{-7} M未満であると、基板5のピットに蛍光性分子が行き渡らなくなるからである。揮発性の有機溶媒としては、例えばメタノール、エタノール等のアルコール類やエーテル類、アセトン、エチレングリコール等が好適に使用できる。

【0022】次に、工程2において、基板5例えばシリコンウエハ上に、レンズクリーニングペーパー6を載置する。基板5は、表面が平滑であれば特に限定されるものではなく、種々の板状の部材が使用できる。また、本実施形態ではレンズクリーニングペーパー6を好適な紙片の例として使用しているが、ある程度の強度及び浸透性があり、パーティクルの出ないものであれば種々の紙片が使用できる。例えば、日本工業規格におけるカーボン原紙(JIS P3901)や薄葉紙(機械ズキ和紙、JIS P4500)が好適に使用できる。

【0023】すなわち、前記JIS P3901に記載されているように、引っ張り強さが縦1.3kg以上、横0.6kg以上、破裂強さ $0.3\text{kg}/\text{cm}^2$ 以上であるカーボン紙と同等な特性を有する紙片が本発明において使用できる。また、前記JIS P4500に記載されているように、裂断長が縦4.0km以上、横1.3km以上である薄葉紙と同等な特性を有する紙片が本発明において使用できる。

【0024】次に、工程3において、工程1で調製した試料溶液7をレンズクリーニングペーパー6の一端に滴下する。試料溶液7の滴下量は、基板5の直径が2インチの場合、例えば $20\mu\text{l}$ ~ $200\mu\text{l}$ が好適であり、使用するレンズクリーニングペーパー6や基板5の大きさにより適宜変更できる。滴下された試料溶液7は、毛细管現象によりレンズクリーニングペーパー6上で広がると共に、レンズクリーニングペーパー6の裏面に浸透し、基板5の表面に達する。

【0025】次いで、工程4において、有機溶媒が蒸発する前に、滴下された試料溶液7が基板5の表面を横切るようにレンズクリーニングペーパー6の他端を引っ張り、基板5の表面に試料溶液7を塗布する。そして、レンズクリーニングペーパー6を基板5から除去して試料

溶液7を乾燥させれば、蛍光性分子の単一層を基板5の表面に並べることができる。このような方法によれば、従来のスピンコート法を用いた場合より均一性の高い単一分子層が得られる。

【0026】

【実施例】さらに、実施例に基づいて、本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1

まず、蛍光性分子の試料溶液7を、次のような手順で調製した。蛍光性分子としては、吸着色素であるローダミンBを使用し、所定濃度となるようにローダミンBをメタノール溶液に溶解し、試料溶液7とした。また、基板5として直径2インチのシリコンウエハを使用し、この基板5上にレンズクリーニングペーパー6を載置した後、図1に示すように、試料溶液7の $100\mu\text{l}$ をレンズクリーニングペーパー6の一端に滴下した。続いて、メタノール溶液が蒸発する前に、試料溶液7が基板5上を横切るようにレンズクリーニングペーパー6を引っ張った。

【0027】次に、図2に示す蛍光光子計測装置を使用し、単一光子計数法により蛍光光子数の定量的評価を行った。図2は、蛍光光子計測装置を画像処理装置等を含めて示した概略図である。図において、光源8として用いたレーザーは、モード同期アルゴンイオンレーザー励起によるキャビティダンパー付きシクロナスモード同期色素レーザーである。このレーザーは、パルス半値幅 10ps 、発振波長 540nm であり、繰り返して 4MHz 、平均出力 14mW で使用した。試料分子の配向の問題を避けるために、バビネ・ソレイユ補償器9を用いて励起光を直線偏光から円偏光に変換し、レンズ10を介して基板5に入射させた。なお、基板5は、3次元に移動可能なステージ11上に搭載されている。

【0028】単一光子計数テレビカメラシステムは、単一光子計数用のカメラヘッド12、イメージ・インテンシファイア(II)コントローラ(以下、単にコントローラとする)13、画像処理装置14、そしてコンピュータ15から構成されている。カメラヘッド12は、リレーレンズ16を介して落射照明蛍光顕微鏡と結合されており、この顕微鏡は2枚のレンズ17、18を備えている。蛍光は、100倍の倍率を有する対物レンズ21を用いて集められる。

【0029】この対物レンズ21は、ニコン(株)製商品名「ニコンCF M PlanSLWD」であり、開口数0.75、作動距離 4.7mm である。なお、基板5上の試料表面からの励起光を遮断するために、ロングパスフィルター19(ニコン(株)製商品名「ニコンBA580」)と二色フィルター20(ニコン(株)製商品名「ニコンDM510」)を用いた。これらのフィルターは、緑色励起光を用いた場合の標準的な組み合わせである。

【0030】また、画像処理装置14上でデジタル化された1画素の画像は、 512×483 ピクセルであり、1ピクセル=0.12 μ mである。レンズ18の焦点距離を100mmとし、試料表面上での励起光強度が $\sim 1.8 \text{ W/cm}^2$ となった。得られたデータは、光子計数カメラの最大感度で30秒間積算した。なお、前述したすべての装置は、清浄度がクラス1000のクリーン・ブース内に設置した。後述する図6に関連した実験を除いて、すべての実験は大気中296Kで行った。

【0031】吸着色素が存在する表面内の蛍光強度分布は、後述する図4に示すように均一ではない。しかし、1枚の画像の全エリア(512×483 ピクセル)について足し合わされた全光子数は、 $1.47 \times 10^{-7} \text{ M}$ の場合を除いておよそファクター3の範囲内で均一となった。ここに、「ファクター3」とは、バラツキの程度が3倍という意味であり、図3の場合、試料溶液の濃度が $1.47 \times 10^{-8} \text{ M}$ のときの全蛍光光子数のバラツキは、ほぼ5000カウント \sim 15000カウントの範囲に収まっている。これを「ファクター3」の範囲で一定と称した。

【0032】この全光子数は、図3に示すように、試料溶液7の調製に用いた色素濃度に対して、近似的に直線関係を示した。図3は、試料溶液濃度と全蛍光光子数との関係を示す線図である。なお、全蛍光光子数とは、画面(512×483 ピクセル)全体の蛍光光子数とバックグラウンドの光子数を加えたものである。吸着の均一性の尺度は、測定した多数の画像における全光子数のバラツキから評価した。

【0033】評価に用いた画像の数は、それぞれ $1.47 \times 10^{-4} \text{ M}$ の場合は10枚、 $1.47 \times 10^{-5} \text{ M}$ の場合は15枚、 $1.47 \times 10^{-6} \text{ M}$ の場合は64枚、 $1.47 \times 10^{-7} \text{ M}$ の場合は50枚であった。求められたバラツキは、 $1.47 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 $1.47 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、及び $1.47 \times 10^{-6} \text{ M}$ の場合ではファクター3以内であった。一方、 $1.47 \times 10^{-7} \text{ M}$ の場合には、ファクター ~ 15 となった。

【0034】この大きなバラツキの原因は、後述する図4(d)に示すように、 $1.47 \times 10^{-7} \text{ M}$ の場合、1画素あたりに含まれる輝点の数がまばらなためである。また、カメラヘッド12の光電面に蛍光が入らないように、図2に示した顕微鏡のレンズ16とレンズ17の間にある窓を閉じた時、観測されたダークカウントは、 ~ 50 カウント/30秒/全画素であった。なお、カメラの感度は最大に設定してある。さらに、窓を開けた時のこのダークカウントを含む全バックグラウンドは、 ~ 330 カウント/30秒/全画素であった。但し、バックグラウンド測定の際には、基板5上には試料溶液7は付着していない。

【0035】図4は、各濃度の試料溶液7を基板5に固定させた場合における蛍光輝点の顕微鏡写真をトレース

した図である。試料溶液の濃度は、同図(a)では $1.47 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、同図(b)では $1.47 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、同図(c)では $1.47 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、同図(d)では $1.47 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。これらの図において、輝点の数は試料溶液7の濃度の増加と共に増加し、同図(d) \sim (a)でそれぞれ3、14、78、117となった。但し、同図(a)では、背景蛍光が増大するので、輝点の同定は曖昧となっている。

【0036】同図(a)から同図(b)にかけて、輝点の数は明らかに飽和している。この結果は、蛍光輝点が色素の吸着に都合の良いサイト上で形成されている可能性を示唆している。さらに、これらの画像から、 $1.47 \times 10^{-5} \text{ M}$ 以上の濃度では、輝点に寄与しないバックグラウンド的な蛍光光子が現れてくることが判る。この過剰な蛍光は、試料溶液の溶媒や空気中の汚染物によるものではなく、色素そのものによるものである。

【0037】なぜならば、1画素当たりの全蛍光光子数(輝点の蛍光+過剰蛍光)と試料溶液濃度とは、図3に示したように、比例関係にあるからである。もしこの過剰な蛍光が何らかの汚染物に起因するならば、過剰な蛍光は試料溶液の濃度によらずに図4のすべての画像に共通して見出されるはずだからである。従って、本発明では揮発性の溶媒を使用しているため、外部から汚染物を取り込み難いことが判る。

【0038】図5は、個々の蛍光輝点に寄与している蛍光光子数を数えて、その蛍光光子数の出現頻度数の統計分布を示すヒストグラムである。同図(a) \sim (c)は、それぞれ $1.47 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 $1.47 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $1.47 \times 10^{-7} \text{ M}$ の試料溶液を使用した場合に対応している。なお、背景蛍光が増大するために輝点の同定が曖昧になるので、 $1.47 \times 10^{-4} \text{ M}$ の試料溶液についてのヒストグラムは作成しなかった。得られた蛍光光子数カウント数は、20カウントおきに丸めてヒストグラムを作成した。また、1000カウント以上の輝点が見出される場合があるが、それらはヒストグラムから除外している。

【0039】これらの図に示される3つのヒストグラムは、すべて100カウント間隔で極大を示している。100カウントの量子化は、吸着色素の調製に用いた試料溶液の濃度に依存しないで現れたものであることを強調しておく。この結果は、100カウントが、本発明の実施形態で設定した実験条件下で1個の色素分子に起因していることを示している。

【0040】この他に、100カウントが1個の色素分子に起因していることを示す2つの実験事実がある。それは、色素の光退色が階段状になって進行し、そのステップがほぼ100カウントあるいはその整数倍で起こっていること(データはここに示していない)、及び所定の実験条件下で1個の色素分子から観測可能な蛍光光子数がほぼ100カウントになることである。従って、図

5に示した100カウントおきに量子化された蛍光光子数は、1個から8個までの色素分子に対応していることになる。

【0041】ところが、図4(b)の場合、輝点に着目すると、100カウント及びその整数倍のカウント数は、面積78~113ピクセルのサークル内に局在化している。一方、輝点以外の背景部分で100カウントを得るためには、面積が約1200ピクセルのサークルを設定しなければならない。この結果から、図4(a)及び(b)に見られる輝点以外の過剰な背景蛍光は非局在化した、おそらく動いている蛍光分子に因るものと考えざるを得ない。

【0042】この推測を確かめるために、蛍光画像の形態の温度依存性を調べた。すなわち、温度を下げると分子を駆動している熱エネルギーが減少するので、非局在化したバックグラウンドが消えて局在化した輝点が現れることが予想される。図6は、 1.47×10^{-6} Mの試料溶液を用い、温度を変化させた場合における蛍光輝点の顕微鏡写真をトレースした図である。同図(a)は66 Kで観測された蛍光輝点を示し、同図(b)は300 Kに昇温して観測された蛍光輝点を示し、さらに、同図(c)は再び66 Kに降温して観測された蛍光輝点を示している。

【0043】同図(a)で観測された蛍光輝点は同図(b)では消滅し、同図(c)で再び観測された。従って、前述した図4(a)及び(b)に示したような非局在化した蛍光は、「動いている色素分子によるもの」という考え方が裏付けられた。これにより、基板5の表面には蛍光性分子の単一分子層が形成されていることが判る。

【0044】なお、図6の蛍光輝点観測の詳細は次の通りである。同図(a)において、いくつかの蛍光輝点がぼんやりとした輪郭の蛍光像の内部に見出された。同図(b)では、ひとつの例外を除いて66 Kで観測された蛍光輝点はほぼ消えてしまった。さらに、同図(c)では、いくつかの蛍光輝点が再び現れた。しかし、輝点の数と輝点のコントラストは同図(a)の場合から変化している場合がある。特に、矢印Aで示した輝点は、完全に消滅している。また、矢印Bで示した輝点(これにはぼんやりとした輪郭の蛍光像の背景を伴っていない)は、3つの画像に共通して見出された。但し、300 Kの場合は(同図(b))、幾分縦長になって観測された。よって、この輝点は色素吸着に都合の良いサイトからのものと思われる。

【0045】また、ここで用いた実験条件は、図4の場合とは異なる点がある。すなわち、光学顕微鏡用のクライオスタットをステージ11上に追加した。また、試料が並べられた基板5の雰囲気は、大気圧ではなく 10^{-6} ~ 10^{-7} Torrとした。対物レンズ21は、倍率20倍、開口数0.4、作動距離20mmの対物レンズ(ニ

コン(株)製商品名「ニコンCF-M Plan SL WD」)を用いた。低倍率の対物レンズを用いた理由は、クライオスタットの厚さ1.5mmの石英製の窓に起因する光学的収差の影響をみかけ小さくするためである。

【0046】このように、実験条件を変更したので、図6で測定した光子数と図3~図5で測定した光子数の定量的な比較はできないので、ここでは蛍光画面の温度依存性のみに注目した。画像全体の総光子カウント数は、図6(a)では69618、同図(b)では29141、同図(c)では49012となり、同図(a)と同図(c)では再現しなかった。

【0047】一方、矢印Bで示した輝点に着目すると、そのカウント数は、図6(a)では797、同図(b)では478、同図(c)では769となり、同図(a)と同図(c)では再現した。画像全体では、同図(a)から同図(c)へとカウント数が減ったのは、雰囲気(気圧)が減少しているために色素分子が基板5から脱着したためと考えられる。

【0048】この結果は、吸着色素には弱く基板5に吸着しているものも存在するという考えを支持している。一方、カウント数が再現していることから、矢印Bで示した輝点は、色素吸着に都合の良いサイトからのものという考えを支持している。なお、この輝点のカウント数が300 K(同図(b))では66 K(同図(a))、

(c)よりも小さくなるメカニズムについては、既に報告されている事実によって説明可能である(例えばKemnitz, K., Tamai, N., Yamazaki, I., Nakashima, N., Yoshihara, K. J. Phys. Chem. 1986, 90, 5094-5101)。

【0049】以上から、固体表面になんら固定化処理をしないで吸着させた色素分子は、局在化と非局在化という2つの異なった状態を採っていることが判る。すなわち、

(1)局在化している蛍光光子はクラスターを形成していて、そのクラスターは色々な数(1個から数個)の色素分子から構成されている。この結果は吸着色素の調製に用いた試料溶液の濃度には依存しない。(2)一方、非局在化した蛍光光子は、 1.47×10^{-6} Mよりも高い濃度の試料溶液を用いて吸着色素を調製した場合に見出された。これは色素分子が動いていることに起因する。このような新規に見出された事実は、吸着状態にある色素分子の物理的性質を今まで以上に詳細に理解するのに貢献することが期待される。

【0050】一般に、基板等の表面で起こる多くの化学現象は、吸着分子の2次元配置や動きに敏感であると考えられる。例えば基板等の表面での反応や触媒作用は、分子同士あるいは分子と基板表面が都合の良い反応経路に適合するように遭遇したときにのみ起こる。表面化学

にとって、その解明は本質的に吸着系の分子の動きを理

解することに依存するものと考えられる。吸着系におけるこれまでの膨大な研究では、分子が一様に分布して固定化されているという描像が仮定されてきた。しかし、このような仮定は必ずしも正しくないということが本発明によって実証された。本発明による蛍光性分子を基板表面に並べる方法、いわば、蛍光単一分子イメージング法が適用できる分子は、蛍光性のものに限定されているが、重要な応用が考えられる。

【0051】その応用は、近い将来の分析化学に見出されるものと考えられる。そこでは、1個を極限とする少数の蛍光ラベル化された、あるいは自己蛍光性の標的分子がシリコンウエハのような基板表面に準備されることになるだろう。本発明方法は、固体表面上に光リソグラフィ技術によって施された微細構造を利用するタイプのミニチュア化された分析化学システムにおける蛍光計測のキーテクノロジーとしてさらに発展させる必要がある。今日、分析化学システムのミニチュア化は、分析化学において急速に発展しつつあるテクノロジーである。本発明で明らかにされた表面上の個々の色素分子の局在性や運動性を理解することは、個体表面を利用する将来の単一分子分析システムに要求されるであろう分子の移動や固定を考えるための出発点になると考えられる。

【0052】実施例2

次に、蛍光輝点が選択的にローダミンBを吸着するような穴の位置と一致するという可能性を明らかにするための実験を行った。試料溶液7の調製、基板5への単一分子層の形成等は、実施例1と同様に行った。実施例2では、基板5にレーザー光を照射し、後述する実験条件により、基板5表面からの散乱光を三次元的に捕らえ、その散乱強度分布から基板5表面上の欠陥や異物の実態を認識する光散乱法を採用している。散乱光の強度測定は、検出器にレーザー光を直接入射した時に得られる出力を1とした時、散乱光強度を $1 \sim 10^{-8}$ の範囲で測定できる。

【0053】前述の図4(d)に示したような観測結果から、蛍光輝点が観測された位置は、主として自然酸化膜で覆われた基板5上に元々存在する穴が存在すると推定した。このような推定の背後にある可能な解釈は、次の通りである。すなわち、試料溶液7を調製するのに用いた吸着色素であるローダミンB溶液の濃度が 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-6} Mと増えるにつれて蛍光輝点の数が増えるのは、基板5上の穴がしだいにローダミンBで埋まってゆくからである。

【0054】一方、吸着色素の試料を調製するのに用いたローダミンB溶液の濃度が 10^{-6} Mで蛍光輝点の数がほぼ飽和して、 10^{-4} Mでは輝点を形成しない蛍光が増加しているのは、穴がローダミンBで埋めつくされて、穴に入りきれなかったローダミンBが溢れたためである。そこで、以下の実験では、 10^{-6} MのローダミンB溶液を用いて調製した吸着試料を用いた。なぜならば、

前述の推定が正しいとすれば、この試料では蛍光輝点の位置と穴の位置の間の相関が高いことが予想されるからである。

【0055】図2に示した蛍光光子計測装置を使用し、吸着試料をレーザー励起して、蛍光測定のために用いた励起光をカットして蛍光を透過するロングパスフィルター(LP)19を顕微鏡からはずして観測したところ、緑色のレーザー光の散乱によるスポットを見出した。この顕微鏡写真をトレースした図を図7(A)に示す。図7(A)は、 10^{-6} MのローダミンB溶液を用いて調製した試料溶液7を蛍光観測用フィルターであるロングパスフィルター19がない状態で散乱光を観測した顕微鏡写真である。

【0056】この図から明らかなように、レーザーの散乱に起因する輝点のみが観測された。なお、用いたレーザーは連続発振のアルゴンイオンレーザー(514.5nm)で、パワー密度は $\sim 0.05 \text{ W/cm}^2$ であった。画像測定に用いた光子計数カメラの感度は最小に設定した。図中の赤の矢印は、蛍光輝点の位置と一致したレーザー散乱光輝点を示す。一方、緑の矢印は蛍光輝点の位置と一致しないレーザー散乱光輝点を示す。

【0057】次に、ロングパスフィルター19を装着して図7(A)の画像を観測したのと同じ視野で蛍光画像を観測した。この時の顕微鏡写真をトレースした図を図7(B)に示す。図7(B)では、連続発振のアルゴンイオンレーザー(514.5nm)のパワー密度は $\sim 5 \text{ W/cm}^2$ であり、画像測定に用いた光子計数カメラの感度を最大に設定した。赤の矢印はレーザー散乱光輝点の位置と一致しない蛍光輝点を示す。この結果は、ローダミンBそれ自身がレーザー散乱光輝点の原因ではないことを示している。ここで用いた光子計数カメラの感度は、画像(A)の場合よりも $\sim 10^4$ 大きい。なお、ここで示した画像からレーザー散乱光輝点の位置と蛍光輝点の位置を詳しく比較することは困難なので、図7

(A)、(B)は共に輝点の選別は原顕微鏡写真を用いて行った。

【0058】図7(A)、(B)の画像を比較すると、レーザー光による輝点の位置と蛍光輝点の位置の間に高い相関があることがわかる。この実験結果は、蛍光輝点が観測された位置は主として自然酸化膜で覆われた基板5上に元々存在する穴である、という推定を支持するものである。もちろんレーザー光による散乱光の輝点の原因として、基板5に付着した粒子の可能性を完全に否定することはできない。

【0059】しかし、クリーニングペーパーを用いて拭き取ることが可能な粒子で汚染された基板5を用いる、すなわち、レンズクリーニングペーパー6による拭き取りをしない場合には、図8(A)、(B)に示すように、レーザー散乱光の輝点の位置と蛍光輝点の位置の相関は図7(A)、(B)と比較して良くない。なお、図

8 (A), (B) は、共に図7 (A), (B) の測定条件とそれぞれ同一であり、顕微鏡写真をトレースした図である。また、図8 (A) に蛍光輝点の位置と一致した散乱光輝点は、矢印で指し示す黒丸で示してある。

【0060】レーザー散乱光を観測することにより、穴と粒子すなわち、凹部と凸部とが共に観測され、蛍光を観測することにより穴すなわち凹部が観測されるため、図8 (A), (B) では相関が良くなかったものである。従って、レーザー散乱光と蛍光の観測結果を勘案することにより、凹部のみの計測が可能となる。すなわち、レーザー散乱光のスポットが異物であるか欠陥であるかの識別が可能となる。特に、周囲の平面に対して凹である欠陥の検出が容易となる。このように、蛍光輝点及び散乱光輝点から、基板表面の構造欠陥を可視化することが可能となる。

【0061】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、揮発性有機溶媒に蛍光性分子を溶解させるので、外部から汚染物を取り込まず、溶媒や汚染物による妨害を受けずに蛍光測定を行うことができる。また、レンズクリーニングペーパーに滴下された試料溶液を基板表面を横切るように引っ張るので、均一性の高い蛍光性分子の単一分子層を簡単に基板表面に並べることができる。

【0062】また、基板表面に並べられた均一性の高い蛍光性分子の単一分子層を測定するので、正確な蛍光計測を行うことができ、蛍光輝点から基板表面の構造欠陥を可視化することができる。さらに、基板表面に並べられた均一性の高い蛍光性分子の単一分子層が付着した基板表面を観察するので、色素分子それ自身による散乱光ではなくて、基板表面それ自身の凹凸に起因する散乱光を正確に計測することができる。この発明によって得られた散乱光輝点の位置と、散乱光観測に用いたものと同じ試料の同じ視野で蛍光輝点の位置を比較することによって、基板表面の構造欠陥を可視化することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施形態による蛍光性単一分子を基板表面に並べる方法を示す概略説明図であり、(a) はそのフローチャート、(b) は基板及びレンズクリーニングペーパーの斜視図である。

【図2】本発明の実施形態で使用する蛍光光子計測装置

を画像処理装置等を含めて示した概略図である。

【図3】試料溶液濃度と全蛍光光子数との関係を示す線図である。

【図4】各濃度の試料溶液を基板に固定させた場合における蛍光輝点の顕微鏡写真をトレースした図であり、

(a) は $1.47 \times 10^{-4} M$ 、(b) は $1.47 \times 10^{-5} M$ 、(c) は $1.47 \times 10^{-6} M$ 、(d) は $1.47 \times 10^{-7} M$ の試料溶液を使用した場合をそれぞれ示している。

10 【図5】個々の蛍光輝点に寄与している蛍光光子数を数えて、その蛍光光子数の出現頻度数の統計分布を示すヒストグラムであり、(a) は $1.47 \times 10^{-4} M$ 、

(b) は $1.47 \times 10^{-5} M$ 、(c) は $1.47 \times 10^{-6} M$ の試料溶液を使用した場合をそれぞれ示している。

【図6】 $1.47 \times 10^{-4} M$ の試料溶液を用い、温度を変化させた場合における蛍光輝点の顕微鏡写真をトレースした図であり、(a) は66 Kで観測された蛍光輝点を示し、(b) は300 Kに昇温して観測された蛍光輝点を示し、(c) は再び66 Kに降温して観測された蛍光輝点を示している。

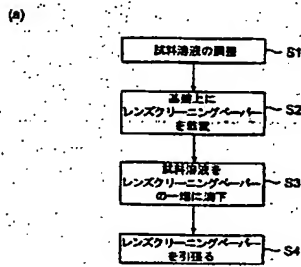
20 【図7】図2に示した蛍光光子計測装置を使用して試料溶液を基板に固定させた場合の顕微鏡写真をトレースした図であり、(A) は顕微鏡からロングパスフィルターをはずして観測した散乱光輝点を示し、(B) は顕微鏡にロングパスフィルターを取り付けた状態で(A) と同じ視野で観測した蛍光輝点を示している。

【図8】図2に示した蛍光光子計測装置を使用して、試料溶液をレンズクリーニングペーパーによる拭き取りをせずに基板に固定させた場合の顕微鏡写真をトレースした図であり、(A) は顕微鏡からロングパスフィルターをはずして観測した散乱光輝点を示し、(B) は顕微鏡にロングパスフィルターを取り付けた状態で(A) と同じ視野で観測した蛍光輝点を示している。

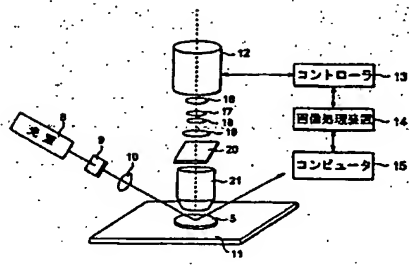
【符号の説明】

5…基板、6…レンズクリーニングペーパー、7…試料溶液、8…光源、9…パビネ・ソレイユ補償器、10、17、18…レンズ、11…ステージ、12…カメラヘッド、13…コントローラ、14…画像処理装置、15…コンピュータ、16…リレーレンズ、19…ロングパスフィルター、20…二色フィルター、21…対物レンズ、A、B…矢印。

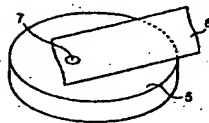
【図1】



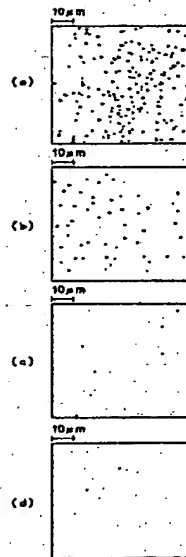
【図2】



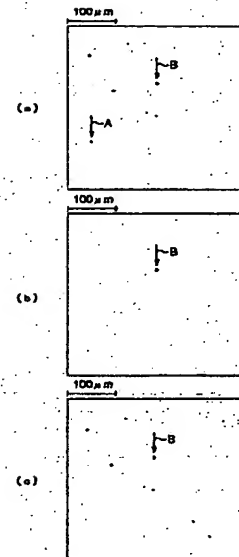
(b)



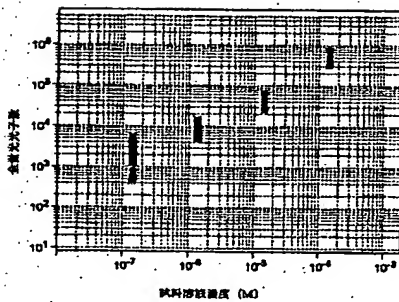
【図4】



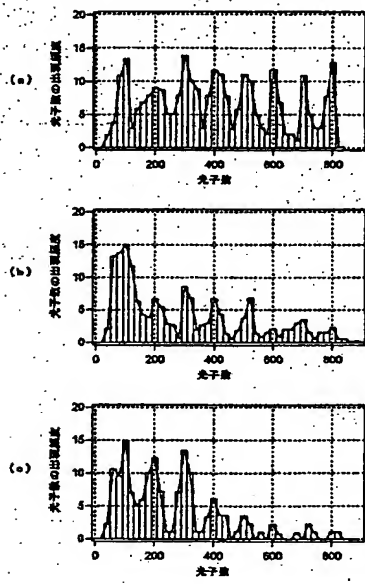
【図6】



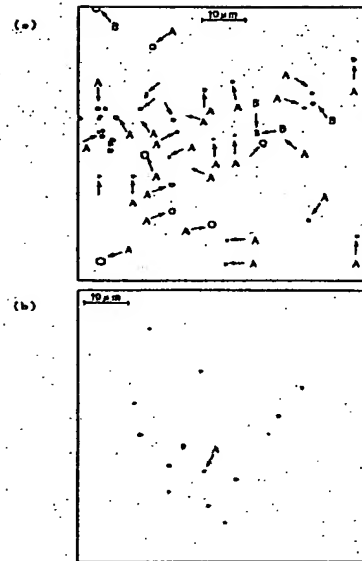
【図3】



【図5】



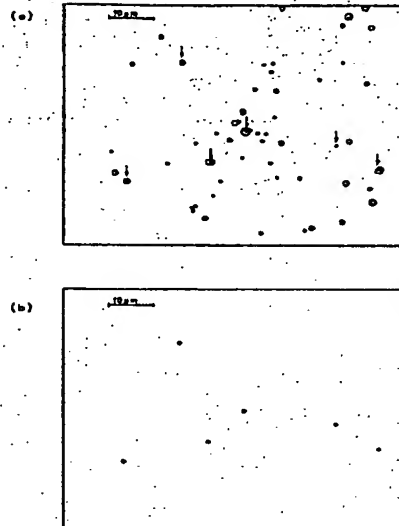
【図7】



(11)

特開平10-185782

【図8】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.